

黄麴菌のアグマチン合成系の解明と醗酵食品への利用

関西学院大学 理工学部 生命科学科

藤原 伸介

ヨーグルトや納豆など醗酵食品は健康長寿を促す高ポリアミン食として注目されている¹⁾。また、ポリアミンの一種であり、前駆体でもあるアグマチンの摂取は、II型糖尿病に代表される生活習慣病諸症状の改善や、それにより誘発されるアルツハイマー病発症リスクを低減する事が示されている^{2,3)}。また、アグマチンは抗ストレス作用に効果的なγアミノ酪酸(GABA)の前駆物質でもある。黄麹菌は、味噌、醤油、清酒、みりんなど日本の伝統醗酵食品のほとんどに関与し、糞菌として日本国国菌にも認定されている。我々は、黄麹菌が固相培地で増殖する際、酸性ストレス下でアグマチンを生産することが示した⁴⁾。一般的にアグマチンは図1の経路で合成されると考えられる。本研究では、黄麹菌のアグマチン生産系を研究用タイプ株を用いて遺伝子レベルで解析し、酵素の性質から、生合成経路の解明を目指した。黄麹菌には、アルギニン脱炭酸酵素の遺伝子オルソログが存在しない。しかし、過去の研究⁴⁾で清酒用の黄麹菌がアルギニン脱炭酸

酵素活性(アグマチン合成活性)を有すること、この酵素活性が固相培養でのみ認められ、pHの低下で促進することが示めされた⁵⁾。本研究では研究用タイプ株でこの現象を確認するとともに、考えられる候補遺伝子を発現し、酵素を組換え体として取得し、生化学的性質を検証した。

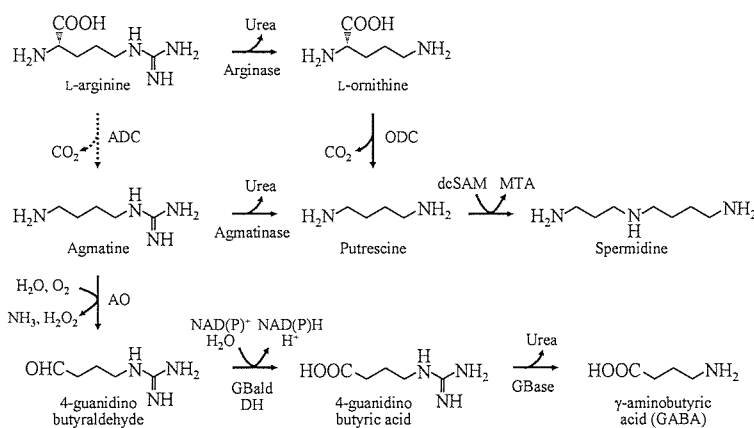


図1 ポリアミンの生合成経路
点線は黄麹菌のアグマチン生合成経路を示す。アグマチンはポリアミン、γアミノ酪酸(GABA)の前駆物質である。

実験方法

1. 使用菌株

麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 株は酒類総合研究所から分与を受けた。大腸菌 *Escherichia coli* DH5α 株はアジレント社から、*E. coli* BL21(DE3) Codon Plus RIL 株はストラタジーン社から購入した。麹菌の固相培養及び液相培養は既報の方法に従って行った⁴⁾。

2. ポリアミン分析

培養上清中のポリアミン画分は、試料に対し10% TCA を試料の1/10量加えボルテックスにより混合し、15,000 rpm、4°Cで10分間遠心し上清を回収した。0.45 μmのフィルター(Millex LH filter, Bedford, MA, USA)を通し、濾液をHPLCに供した。カ

ラムには強酸性陽イオン交換樹脂 (MCIGEL CK-10S, MITSUBISHI CHEMICAL, Tokyo, Japan) を使用した。カラムオープン時は 70 °C に設定し、移動相は流速 1.0 mL/min で成分を分離溶出した。発色相は流速 0.5 mL/min に設定し、カラムから溶出したポリアミンを *o*-フタルアルデヒドを含む発色相と反応させポストカラム誘導体化を行った。励起波長 325 nm、蛍光波長 450 nm で誘導体化したポリアミンの蛍光検出を行なった。

3. アグマチン合成活性の評価

固相培地で培養した菌体を液体窒素で冷却凍結した。回収した菌体を 0.85 % NaCl で洗菌し、液体窒素中で速やかに凍結し、破砕液とした。液相培地として 0.5 % 米粉を含む培地に *A. oryzae* RIB40 株の分生子を植菌し、30°C, 24 時間振盪培養した。菌糸凝集体を濾紙 (ADVANTEC Toyo Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan) によって回収し、0.85 % NaCl で洗菌し、液体窒素中で速やかに凍結した。上記の方法で得た固相培地及び液相培地からの破砕物を、プロテアーゼインヒビターカクテル (cOmplete Mini; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を含む 50 mM リン酸バッファー (pH7.0) に懸濁した。1 mM の L-アルギニン、0.1 mM のピリドキサルリン酸 (PLP) 4 mM MgSO₄ を含む 25 mM のクエン酸バッファー (pH3.0, 4.0, 5.0, 6.0) に、50 µL の破砕液を加え 30°C で 60 分間反応させた。10 % トリクロロ酢酸 (TCA) を 50 µL 加え、反応を停止し、混合して水中に移した。反応液を 0.45 µm フィルター (Millex LH filter, Bedford, MA, USA) に通し HPLC に供し、ポリアミン量を定量し、アグマチン合成活性 (Agm [pmol/min/µg^{61cNAc}]) を算出した。

4. 転写量解析

固相培地および液相培地からの RNA 抽出は、グアニジンイソチアネート法により行った。抽出した RNA を鋳型に用いて PCR を行い、DNA が存在しないことを確認した。RT-PCR には *Tth* DNA polymerase (ロッシュ社) を用いて行い、18S rRNA を内部標準とし、*LDC1* および *LDC2* の転写産物の有無を調べた。精密定量は SuperScriptTM III PlatinumTM SYBRTM Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, USA) と ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA) を用いた定量 RT-qPCR により行った。内部標準に用いた 18S rRNA 領域を用いた。

5. *A. oryzae* RIB40 株由来リジン脱炭酸酵素の発現及び精製

組換え *LDC1* の取得には、*LDC1* 領域を pET28a にクローン化して構築したプラスミド pET28a-*ldc1* を用いて形質転換した *E. coli* BL21 CodonPlus DE3 (RIL) を用いた。Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) で誘導発現後、集菌し、遠心して上

清画分を取得した。ニッケルアガロースを使用したアフィニティーカラムに供し、分画精製した。精製したタンパク質の濃度測定は Bovine Serum Albumin (BSA) を標準として用い、ブラッドフォード法により行った。

6. 組換え LDC1 の活性評価

pET28a-*ldc1* を保持する *E. coli* BL21 CodonPlus DE3 (RIL) 破砕液を用いてアルギニンもしくはリジンを基質としてアグマチンおよびカダベリンの合成活性を測定した。IPTG を添加して、12 時間振盪培養し、培養液を集菌し、50 mL の破砕バッファー (20 mM リン酸バッファー (pH7.5), 50 mM NaCl, 0.2 mM PMSF, 1 mM 2-ME, 1 mM DTT, 40 μ M PLP, 10 mM MgSO₄) を加え、超音波破砕を行った。遠心により上清画分を取得し、酵素反応に用いた。0.1 mM の L-アルギニンあるいは 0.1 mM の L-リジンと 0.1 mM のピリドキサルリン酸および 4 mM MgSO₄ を含む 25 mM のクエン酸バッファー (pH3.0, 4.0, 5.0, 6.0) に 50 μ L の破砕液を加え 30 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた。10 % TCA を 50 μ L 加え反応を停止させ、ボルテックスにより混合し氷中に移した。反応液は 0.45 μ m フィルター (Millex LH filter, Bedford, MA, USA) に通し、濾液を HPLC に供し、アグマチン、カダベリン量を定量した。ADC 活性はアグマチンの合成活性 (Agm [pmol/min/mg])、LDC 活性はカダベリンの合成活性 (Cad [pmol/min/mg]) として算出した。

実験結果及び考察

1. RIB40 株におけるアグマチン産生の特性

清酒製造用に使用されている黄麹菌は低 pH 環境下でアグマチンを高生産することが明らかになっている⁴⁾。特にアルギニン脱炭酸活性 (アグマチン合成活性) は固相培養でのみ認められ、pH の低下で誘導される。これらの情報は清酒醸造用の菌株で確認されたことである。これらのゲノムは解読されておらず、遺伝学的解析を行うにはゲノム情報が明らかになっている株が好ましい。そこで黄麹菌の研究用タイプ株である RIB40 株を用いて pH3、pH7 に調整した蒸米培地 (固相培地) および粥状の米培地 (液相培地)

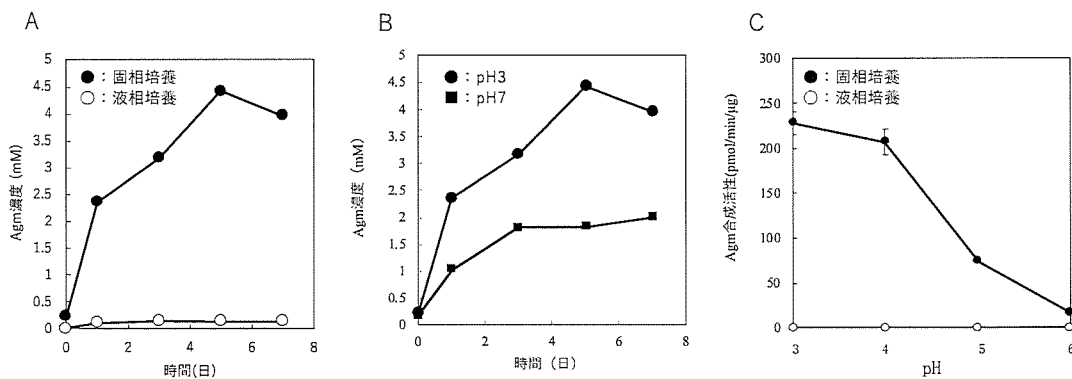


図 2. RIB40 株のアグマチン産生特性

(A). 固相、液相培養におけるアグマチン産生 (pH3) ; (B). 固相培養における pH 依存性 ; (C). RIB40 株のアグマチン合成酵素の pH 依存性

を用いて培養し、培養上清中のアグマチンを高速液体クロマトグラフィーにより定量した。次に、蒸米培地と 0.5 % 米粉培地（液相培地）を用いて RIB40 株を培養し、無細胞抽出液を用いてアグマチン合成活性を測定した（図 2）。RIB40 株においても固相培養特異的に、低 pH 環境下でアグマチンが合成されることが確認された。また、無細胞抽出液（粗酵素液）を用いた検証からも、アグマチン合成酵素は低 pH でその活性が高まることが示された。

2. アグマチン合成に関与する酵素の推定

RIB40 株は異なる培養条件でトランスクリプトーム解析が行われており、発現動態データが公開されている (<https://nrif21.nrif.go.jp/CFGD/>)。アグマチンはアルギニンの脱炭酸反応で合成されるが、麹菌にはアルギニン脱炭酸酵素（arginine decarboxylase; ADC）のオルソログが存在しない。そのため、塩基性アミノ酸の脱炭酸酵素が ADC として機能していることが考えられた。そこで、RIB40 株の ADC を同定するにあたり、PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素に着目した。アミノ酸配列をもとに系統樹を作成し、候補を絞り、固相及び液相培養時の遺伝子の発現動態を酒類総研データベースにて調べた。図 3 に示すとおり、リジン脱炭酸酵素をコードしている遺伝子のひとつ *LDC1* に、固相培養で著しい転写量の上昇が認められた。

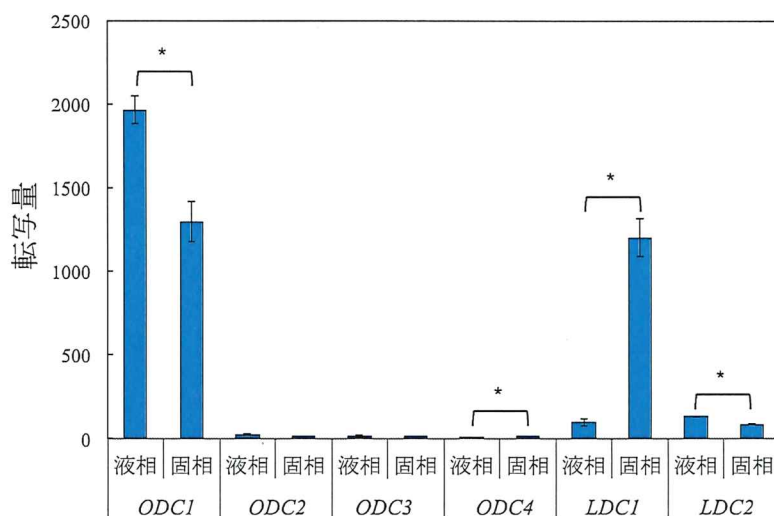


図 3. ODC, LDC 遺伝子の転写量
酒類総合研究所のデータ (<https://nrif21.nrif.go.jp/CFGD/>) に基づき作成。

そこで 2 種類の LDC に注目し、正確な転写量を RT-qPCR 法にて比較検証した。図 4 に示すように *LDC1* 遺伝子が固相培地で高発現していることが明らかになった。同じ LDC でも *LDC2* 遺伝子は液相培地での転写量の方がわずかに高かった。この結果から *LDC1* が ADC として機能している可能性が示唆された。

A

B

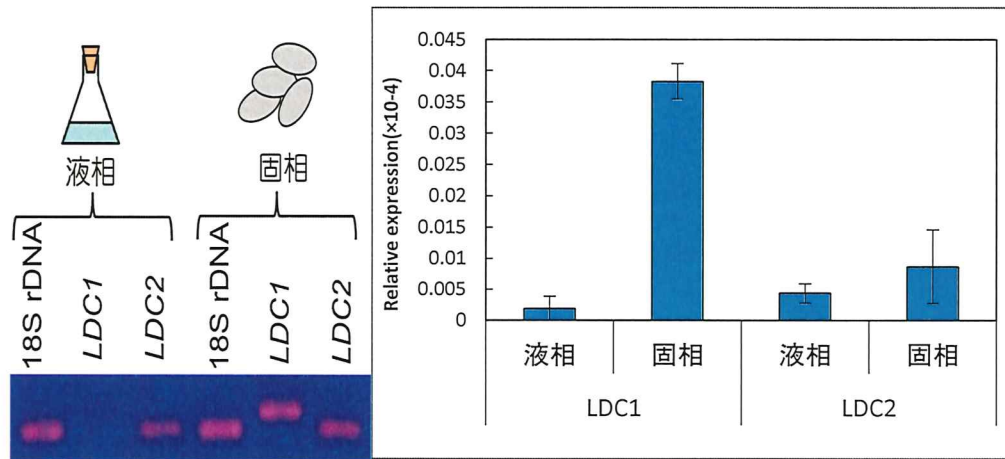


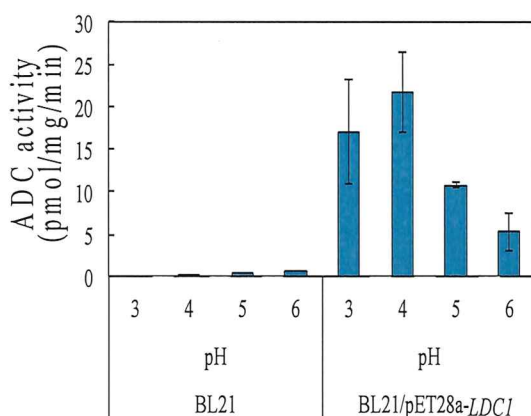
図 4. *LDC1* 及び *LDC2* 遺伝子の転写量解析

(A), RT-PCR による検証; (B), RT-qPCR 法による検証. 固相, 固相培地; 液相, 液相培地

3. 大腸菌粗抽出液による酵素活性測定

A. oryzae RIB40 株のゲノムから *LDC1* をコードする遺伝子全長をプラスミド pET28a にクローニングし、イントロン領域を部位特異的変異導入法にて除去した。大腸菌で高発現を行い、細胞破碎液から酵素活性測定を行った。基質としてアルギニンもしくはリジンを用い、PLP 存在下で酵素活性測定を行った。アルギニンを基質として酵素活性測定を行ったところ (図 5A)、*LDC1* 抽出液から ADC 活性が確認された。pH3 から 4 で顕著な活性を示した。このことから *LDC1* は低 pH で ADC 活性を持つと考えられる。一方で、リジンを基質とした場合にもより高い活性を示し、pH6 において最大となった (図 5B)。中性付近では *LDC1* は主にリジンを基質として働き、低 pH (pH3 から 4) ではアルギニンを基質としうると予想された。

A



B

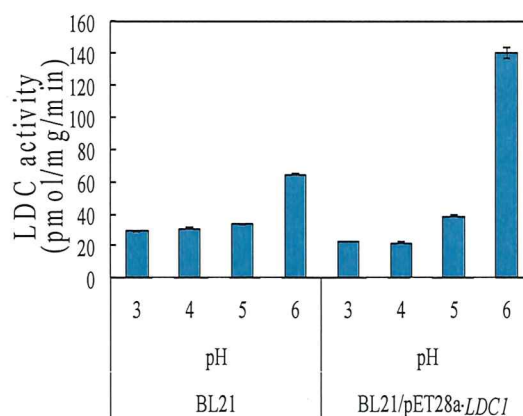


図 3-5 大腸菌粗抽出を用いた酵素活性測定結果

A: Arg を基質とした ADC 酵素活性 B: Lys を基質とした LDC 酵素活性

4. 組換え LDC1 の精製

次に細胞破碎液からニッケルアフィニティーカラムを用い、精製を行った(図6)。精製された組換え LDC1 の酵素活性を検証したところ、精製 LDC1 は LDC 活性のみ示した。前項の実験で検出された ADC 活性が、大腸菌細胞抽出液に由来することが考えられるが、LDC1 を高発現した細胞抽出液に有意な活性差がみられることから、LDC1 が精製される段階で ADC として機能するための補因子を失ったと推察される。粗酵素液では、コア酵素に結合している補因子が残っており、ADC 活性が示されたものと考えられる。この点を検証するために、粗酵素液をゲルろ過カラムに供し、機能分子の大きさを予測した。

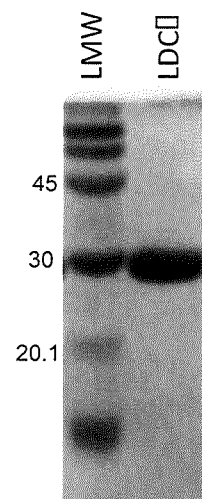


図6. LDC1 の精製

5. LDC1 の高次構造の予測

ゲル濾過クロマトグラフィーを用い、LDC1 活性分子の分子量の推定を試みた。大腸菌で組換え体として発現した細胞菌体を超音波破碎後、遠心し上清画分を取得した。濃縮した上清画分 0.5 mL を Superdex 200 10/300 カラム (GE healthcare) に供し、分画した。得られた各画分を用いて活性測定を行なった。ADC 活性及び LDC 活性のピーク画分を調べたところ、どちらの活性も同じ画分に出現し、440 kDa よりも大きいことが判明した。LDC1 の単量体の分子質量は 26.4kDa であるので、10 量体よりもはるかに大きい構造をとっていることが示された。これは細菌や植物由来の LDC や ADC と比較しても巨大である。系統解析では、LDC と ADC は相同性が極めて高く、近縁性が指摘される。例えば *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Selenomonus ruminantium* の ADC が該当する^{6, 7)}。*E. coli*, *S. typhimurium* においては ADC は細胞内の pH が低くなると誘導され、2 量体の不活性型から 10 量体の活性型に変化する。また、*S. ruminantium* も細胞内で単量体と 2 量体の構造が存在し、2 量体の分子が活性を示す事が明らかとなっている。これらの知見を参考にすると、*A. oryzae* の LDC1 においても pH 変化によって構造が変化し、基質特異性が変わることが推察される。

要約

固相培養で低 pH 特異的にアグマチンが生産される現象を、研究用タイプ株 *Aspergillus oryzae* RIB40 株で検証したところ、他の清酒用麹菌と同様の特徴が示された。RIB40 株にはアグマチン合成酵素であるアルギニン脱炭酸酵素 (ADC) の遺伝子オルソログが存在しない。そこで新規の ADC が存在すると予想し、発現の特徴から

RIB40 株の ADC 推測を試みた。まず、培養条件特異的な転写動態データをもとに固相培養で発現量が増加する遺伝子を抽出した。アグマチンはアルギニンからの脱炭酸反応で合成されることに注目し、塩基性アミノ酸の脱炭酸酵素にアグマチン合成活性があると予想した。さらに系統解析から PLP 依存的アミノ酸脱炭酸酵素のうち、オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) とリジン脱炭酸酵素 (LDC) が ADC 活性を有する酵素である可能性が示された。特に LDC1 が固相培地で液相培地よりも顕著に転写量が上昇していた。そこで、LDC1 を大腸菌の高発現系を用いて産生し、酵素の機能解析を行った。LDC1 は、pH3~4 にて ADC 活性を示し、pH6 で LDC 活性を示した。つぎに、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーにて精製した LDC1 を用いて、酵素活性測定を行った。Mg²⁺ イオン、Mn²⁺ イオン、Cu²⁺ イオンを添加することで LDC 活性はみられたが、どの金属イオンの添加でも ADC 活性は見られなかった。つまり、LDC1 は ADC として働く可能性が高いが、活性を示すには PLP 以外の補因子の存在が必要であると考えられる。ゲル濾過解析の結果、本酵素は 10 量体以上の多量体構造をとることが予想された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり研究助成を賜りました公益財団法人タカノ農芸化学研究財団に心から感謝申し上げます。また本研究の遂行に協力いただいた関西学院大学大学院理工学研究科加藤紗也さん、理工学部講師福田青郎博士、理工学部研究員赤坂直紀博士に厚くお礼申し上げます。

文献

- (1) Soda K, Dobashi Y, Kano Y, Tsujinaka S, Konishi F (2009) Polyamine-rich food decreases age-associated pathology and mortality in aged mice. *Exp Gerontol* 44:727-732.
- (2) Nissim I, Horyn O, Daikhin Y, Chen P, Li C, Wehrli SL, Nissim I, Yudkoff M (2014) The molecular and metabolic influence of long term agmatine consumption. *J Biol Chem* 289:9710-9729.
- (3) Kang S, Kim CH, Jung H, Kim E, Song HT, Lee JE (2017) Agmatine ameliorates type 2 diabetes induced-Alzheimer's disease-like alterations in high-fat diet-fed mice via reactivation of blunted insulin signalling. *Neuropharmacology* 113:467-479.
- (4) Akasaka N, Kato S, Kato S, Hidese R, Wagu Y, Sakoda H, Fujiwara S (2018) Agmatine production by *Aspergillus oryzae* is elevated by low pH during solid-state cultivation. *Appl Environ Microbiol* 84:e00722-18

- (5) Akasaka, N. and Fujiwara, S. (2020) The therapeutic and nutraceutical potential of agmatine, and its enhanced production using *Aspergillus oryzae*. *Amino Acids* 52:181–197.
- (6) Liao S, PoonpairajP, Ko KC, Takatuska Y, Yamaguchi Y, Abe N, Kaneko J, Kamio Y. (2008) Occurrence of agmatine pathway for putrescine synthesis in *Selenomonas ruminatum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 72:445–455.
- (7) Shah R, Akella R, Goldsmith EJ, Phillips MA. 2007. X-ray structure of *Paramecium bursaria* Chlorella virus arginine decarboxylase: insight into the structural basis for substrate specificity. *Biochemistry* 46:2831–2841.